

Rec'd PCT/PTO 18 JAN 2003

PCT/JP03/09059

10/521691

17.07.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 7月18日

出願番号
Application Number: 特願2002-210040
[ST. 10/C]: [JP2002-210040]

出願人
Applicant(s): 財団法人大阪産業振興機構

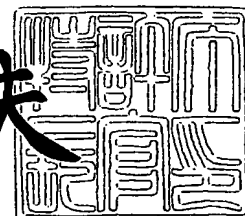
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 R6659

【提出日】 平成14年 7月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C239/14

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野（精神医学）内

【氏名】 大河内 正康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市山田丘2-2、D3 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学講座・プロセッシング異常疾患分野（精神医学）内

【氏名】 武田 雅俊

【特許出願人】

【識別番号】 801000061

【氏名又は名称】 財団法人大阪産業振興機構

【代理人】

【識別番号】 110000040

【氏名又は名称】 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

【代表者】 池内 寛幸

【電話番号】 06-6135-6051

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 139757

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 N o t c h 由来新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N o t c h タンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記 N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解により NICD (N o t c h intracellular cytoplasmic domain) が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。

【請求項 2】 N o t c h シグナル伝達に比例して細胞外に放出される請求項 1 記載のポリペプチド。

【請求項 3】 細胞外への放出が、プレセニリン依存的タンパク質分解により生ずる請求項 1 または 2 記載のポリペプチド。

【請求項 4】 N o t c h タンパク質において、S 3 でのタンパク質分解と同時に若しくはこれと前後しておこる、S 3 より N 末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解 (S4 切断) により、生じて放出される請求項 1 から 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 5】 N o t c h タンパク質において、S 3 より N 末端側の部分でのタンパク質分解部位 (S4) が、細胞膜貫通部分のアミノ酸残基部分である請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】 配列番号 1 から配列番号 18 の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 7】 配列番号 1 から配列番号 18 の少なくとも一つの配列番号のアミノ酸配列において、1 個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、N o t c h タンパク質由来であり、前記 N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解により NICD が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド。

【請求項 8】 N o t c h シグナルに比例して細胞外に放出される請求項 7 記載のポリペプチド。

【請求項 9】 細胞外への放出が、プレセニリン (Presenilin) 依存的タンパク質分解により生じる請求項 7 または 8 記載のポリペプチド。

【請求項 10】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載のポリペプチドを含むバイオマーカー。

【請求項 11】 Notch シグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出するための請求項 10 記載のバイオマーカー。

【請求項 12】 請求項 1 から 9 のいずれかに記載のポリペプチドを認識可能な抗体。

【請求項 13】 モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体である請求項 12 記載の抗体。

【請求項 14】 Notch シグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病からなる群から選択される少なくとも一つを検出する試薬であって、請求項 12 または 13 記載の抗体を含む試薬。

【請求項 15】 請求項 1 から 9 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 16】 DNA 若しくは RNA である請求項 15 記載の遺伝子。

【請求項 17】 請求項 15 または 16 記載の遺伝子を組み込んだベクター。

【請求項 18】 請求項 17 記載のベクターにより形質転換された形質転換体。

。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、Notch タンパク質の新規膜内タンパク質分解に由来する新規ポリペプチドおよびそれを用いたバイオマーカー並びに試薬等に関する。なお、本発明の説明において、Notch のタンパク質分解部分については、Site-1;S1、Site-2;S2、Site-3;S3、Site-4;S4 と略記する。なお、Site-4 (S4) は、後述のように、本発明者等が発見した膜内の新規タンパク質分解部位である。

【0002】

【従来の技術】

Notchは、細胞表面に存在するタイプ1膜貫通型タンパク質であり、細胞外部分にEGFリピートを持ち、細胞内部分にアンキリンリピートを含む転写調節因子であるNICD (Notch Intracellular Cytoplasmic Domain) を持つ。

Notchは、細胞の分化に関する細胞間情報伝達に関与することが知られており、例えば、脳神経系の発生過程では、外胚葉系の細胞の一部が神経前駆細胞（幹細胞）に分化し、さらにニューロン細胞やグリア細胞へと分化するが、この過程において、Notchを介した細胞間情報伝達が重要である。Notchを介した細胞間情報伝達のメカニズムは、つぎの通りである。まず、Notchは、Notchシグナル伝達の受け手側細胞のレセプターとして発現される。細胞表面に輸送されたNotchは、furin等のプロテアーゼで細胞外部分領域（S1）で切断されて2分子になっているが、これらはS-S結合で結合した状態で、そのまま細胞表面に存在する。次に、Notchシグナル伝達の送り手側の細胞が近接して存在した場合、その細胞表面にはNotchリガンド（Delta、Serrate、Lag-2のDSLファミリー等）が発現されている。これら2つの条件が整い、細胞表面でNotchリガンドがレセプターであるNotchと相互作用すると、段階的なタンパク質分解が誘導されシグナル伝達を開始される。即ち、Notchは細胞膜表面付近（S2）で切断され、さらにこの切断が引き金になって細胞膜内あるいは細胞内側の細胞膜の極めて近傍（S3）で切断が起こり、その結果生ずる細胞内部分であるNICDが細胞内に放出され、これが核内に移行し、CSLファミリー（CPB、SuH、Lag-1；転写因子）と結合することで標的遺伝子の転写を調節する。上記のS3部位での切断には、アルツハイマー病に関連するプレセニリンが関与している。

【0003】

このように、Notchは細胞分化における細胞間情報伝達に極めて重要であるが、前記脳神経系の分化の他に、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等にも関係していることが最近明らかになり注目を集めている（例えば、大河内等「アルツハイマー病とプレセニリンの生物学」分子精神医学 Vol.1 No.3 2001、影山等「Notchによる神経分化制御」タンパク質質 酵素 核酸 Vol.45 No.3 2000、Brian et.al「A carboxy-terminal deletion mutant of Notch 1 accelerates lymphoid oncogenesis in E2A-PBX1 transgenic mice

」 Blood Vol.96 No.5 2000 Sep.1 p1906-1913)。したがって、N o t c h シグナル伝達の検出は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等の研究や診断に極めて重要な技術であり、その早期確立が求められている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、N o t c h シグナル伝達を検出するための細胞外分泌マーカーとなり得る物質の提供を、その目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、N o t c h の一連のタンパク質分解過程で、S 3 部位での切断の際、細胞膜中に残されたポリペプチドが、細胞外に放出されるという仮説を立て、その検討を行うことにした。すなわち、細胞膜中の残されたポリペプチドが細胞外に放出されるとすれば、これがN o t c h シグナル伝達のマーカーになり得るからである。本発明者等によるN o t c h シグナル伝達の一連の研究の結果、S 3 の分解箇所とは別の部位（膜貫通部分内にある）で第4番目の切断が生じ、この切断により生じたポリペプチドが細胞外に放出することを突き止め、本発明に至った。

【0006】

すなわち、本発明の新規ポリペプチドは、N o t c h タンパク質由来の新規ポリペプチドであり、前記N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き膜内タンパク質分解によりNICD (N o t c h intracellular cytoplasmic domain) が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。このポリペプチドは、抗体等で検出できるから、N o t c h シグナル伝達を検出するためのマーカーとして使用できる。また、N o t c h シグナル伝達は、細胞分化、細胞の腫瘍化、アルツハイマー病、アポトーシス等に関連しているため、本発明の新規ポリペプチドは、これらの検出用マーカーとして使用できる。また、後述するように、本発明の新規ポリペプチドにおいて、C 末端が異なる複数種類のポリペプチドがある。なお、以下において、本発明の新規ポリペプチドを、「N o t c h - β (N β) 」とも言う。また、前記膜内のタン

パク質分解は、細胞膜に限定されず、その他の細胞のオルガネラ膜も含まれる。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について、さらに詳しく説明する。

【0008】

本発明のポリペプチドは、N o t c h シグナル伝達に比例して細胞外に放出され、しかも、この細胞外への放出の直前のタンパク質分解である新規タンパク質分解は、プレセニリン依存的であり、プレセニリン機能が阻害されれば、本発明のポリペプチドの放出も減少する。

【0009】

本発明の新規ポリペプチドは、N o t c h タンパク質において、S3でのタンパク質分解と同時若しくはこれと前後しておこる、S3よりN末端側の細胞膜貫通部分でのタンパク質分解(S4切断)により、生じて放出される。

【0010】

本発明の新規ポリペプチド(N β)のアミノ酸配列は、配列番号1から18のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。配列番号1から18において、配列番号1から9までが、マウスの配列であり、配列番号10から18までがヒトの配列である。また、配列番号1から18のアミノ酸配列は、1個若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であってもよい。このようなアミノ酸配列からなるポリペプチドも、N o t c h タンパク質由来であり、前記N o t c h タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外タンパク質分解に続き細胞膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。そして、このポリペプチドも、N o t c h シグナルに比例して細胞外に放出され、細胞外への放出がプレセニリン依存的である。なお、本発明の新規ポリペプチドは、生物から得られたものであってもよく、また人工的に合成したものであってもよい。また、前記生物の種類も限定されず、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ブタ、ウシ、ショウジョウバエ、線虫等であってもよい。また、本発明の新規ポリペプチドの由来となる組織や細胞の種類も限定されず、即ち、未分化、分化を問わない体細胞および組織で

あり、例えば神経、骨髄、癌細胞および組織等であってもよい。

【0011】

本発明のバイオマーカーは、前記本発明の新規ポリペプチドを含むものであり、Notchシグナル伝達、細胞分化、腫瘍、アポトーシスおよびアルツハイマー病等の検出に使用できる。なお、本発明のバイオマーカーは、その他の成分を含有していても良く、また前記新規ポリペプチドそのもの（単独）であってもよい。このバイオマーカーは、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体を含む試薬で検出できる。前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体は、通常の方法で作成でき、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体であってもよい。前記試薬は、前記新規ポリペプチドを認識可能な抗体の他に、この抗体を抗原とする標識化抗体若しくは前記新規ポリペプチドを認識可能な標識化抗体を含んでいてもよい。前記標識化は、例えば、蛍光物質、酵素（その基質が酵素反応で発色するもの等）、放射性物質、アガロースなどの担体等で行うことができる。

【0012】

本発明の遺伝子は、前記本発明の新規ポリペプチドをコードする遺伝子であり、DNA若しくはRNAである。また、本発明のベクターは、前記遺伝子を組み込んだものであり、本発明の形質転換体は、前記ベクターを用いた形質転換体である。

【0013】

つぎに、本発明の新規ポリペプチドが細胞外放出される一例を、図7の左側に示す。なお、同図右側は、アルツハイマー病におけるアミロイドベータ ($A\beta$) の細胞外放出の一例を示している。同図左側に示すように、NEXT (Notch Extracellular Truncation) のアミノ末端は、TACE (TNF α -Converting Enzyme) による細胞外切断により生成される。S2部位で切断されたNEXTは、さらに、S3部位の切断により、NICDが核内に移行し、これと同時に若しくは前後して、S4部位の切断（本発明者等が初めて見出した第4のNotchのタンパク質分解部位）により、N β （本発明の新規ポリペプチド）が、細胞外に放出される。

【0014】

つぎに、本発明の新規ポリペプチド (N β) のC末端のアミノ酸配列の例を、

図4bに示す。同図には、マウスの4種類のN o t c h (mN o t c h 1~4)、ヒトの4種類のN o t c h (hN o t c h 1~4) および β APPにおける、それぞれのN β 若しくは細胞外放出フラグメントのC末端周辺の配列を示している。図示のように、主要なS4切断部位は、推定膜貫通ドメイン(TM)領域において、数アミノ酸残基ほどN末端側に位置する(図において、左側の三角矢印で示す)。図示のように、主要な切断部位周辺のアミノ酸配列はmN o t c h-1~4の間で保存されていない。しかし、S3切断部位であるバリニン1743は保存されている(図において、右側の三角矢印で示す)。このように、S4切断部位はS3と異なり多様性があるのが特徴である。この多様性はS4セクレターゼの切断配列認識機構が特殊であることを反映していると推察される。

【0015】

【実施例】

以下、本発明の実施例について説明する。なお、実施例における試薬、材料および実験手法は、以下のとおりである。

【0016】

(試薬)

γ -セクレターゼ(γ -Secretase)阻害剤である、[(2R, 4R, 5S)-2-Benzyl-5-(Boc-amino)-4-hydroxy-6-phenyl-hexanoyl]-Leu-Phe-NH₂は、Bachem社から購入した。

【0017】

(プラスミド)

C末端に6回連続するc-m y c配列を付加したN o t c h Δ E-M1727V (N Δ E) およびNICDをコードするcDNAを、プラスミドpcDNA3 hygroに挿入したものは、Schroeter等の方法により調製した(Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). N o t c h-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature. 393, 382-386.)。なお、前記cDNAは、R. Kopan博士から提供されたものを使用した。N末端にFLAG配列を付加したNEXT、即ちFLAG-NEXT (F-NEXT)は、2段階の部位特異的突然変異誘発(2-step site-directed mutagenesis)により調製した。第一段階では、F-NEXT M

1727V (F-NEXT M1727V)を、部位特異的突然変異誘発キット (ExSite PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社) を用いて製造した。その際、NΔEを鋳型として使用し、また、下記の2つのプライマー1、2 (配列番号19、20) を調製した。

【0018】

プライマー1 : 5-P-ATCGTCGTCCTTGTAGTCTCTCAAGCCTCTTGCGCCGAGCGCGGGCAGCAGCGT
TAG-3'

プライマー2 :

5-P-GACAAGATGGTGATGAAGAGTGAGCCGGTGGAGCCTCCGCTGCCCTCGCAGCTG-3'

【0019】

第二段階では、F-NEXTを、部位特異的突然変異誘発キット (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit、Stratagene社) を使用して、部位特異的突然変異誘発により調製した。その際、F-NEXT M1727Vを鋳型として使用し、また、下記の2つのプライマー3、4 (配列番号21、22) を調製した。

【0020】

プライマー3 ; 5-CCTCGCAGCTGCACCTCATGTACGTGGCAGCG-3'

プライマー4 ; 5-CGCTGCCACGTACATGAGGTGCAGCTGCGAGG-3'

【0021】

これらの変異体について、塩基配列を決定 (シーケンス) し、突然変異誘発が成功したことを確かめた。

【0022】

(抗体)

ポリクローナル抗体 (L652) は、ヒトNotch1のV1722からG1743の間のアミノ酸配列 (S2部位からS3部位の間の配列) のポリペプチドに対する抗体である。この抗体 (L652) は、次のようにして作製した。まず、抗原となる前記ポリペプチドを準備した。このポリペプチドは、疎水性アミノ酸を多く含んでいることが特徴である。このため、アルツハイマー病アミロイドβタンパク質に対する抗体作成時に利用したのと同じ方法で抗体を作成した。即ち、キャリアタンパク質と結合させずに直接水溶し、同容積のリン酸バッファー

(2倍濃度)を加え、アジュバントと共に乳化し、この乳化物をウサギに注射した (Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y., Haass, C. (1997). Intracellular generation and accumulation of amyloid beta-peptide terminating at amino acid 42. J Biol Chem 272, 16085-16088)。抗c-mycモノクローナル抗体 (9E10) および抗FLAGモノクローナル抗体をアガロースに共有結合させた試薬 (M2-アガロース) は、市販品を使用した。

【0023】

(培養細胞および細胞株)

ヒト胎児腎臓293細胞 (K293細胞), N2a細胞およびCOS細胞を、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ゼオシン (zeocin; PS1発現を選択するため) および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ハイクロマイシン (hygromycin; NΔEおよびF-NEXT発現を選択するため) を添加したDMEM培地にて培養した。K293細胞はPS1 wt, PS1 L286V および PS1 D385Nを安定に発現する ADDIN ENRfu (Okochi et al, 2000, Kulic et al, 2000, Wolfe et al, 1999)。NΔEおよびF-NEXTの細胞への導入は、商品名Lipofectamine 2000 (Invitrogen社)を用いて行った。

【0024】

(パルス-チェイス実験)

NΔEを発現する細胞から、NΔEのN末端フラグメント (NTF: Nβ) が放出されるかを判断するために、NΔEおよびNICDを安定的に導入したK293細胞を、10cmディッシュ中で、コンフルエントな状態まで培養した。そして、その細胞を、MEMビタミン溶液 (Gibco社) および非標識アミノ酸を添加したイーグルの平衡塩溶液中に $300\mu\text{Ci}$ (^3H (アミノ酸 (トリチウム化アミノ酸混合液; tritiated amino acid mixture, Amersham社) を加えた培養液中で、代謝的にパルスラベルを2時間行い、その後、10%FCS/DMEMで6時間チェイスした。Nβが放出されるかどうか判断するため、F-NEXTを発現する細胞を、最初に、メチオニン非含有培地で40分間メチオニン飢餓状態で培養し、ついで、メチオニン非含DMEMにおいて、 $400\mu\text{Ci}$ の(^{35}S (アミノ酸混合液 (Redivue Promix, Amersham社)で、1

時間パルスラベルをし、つづいて、過剰量の非標識メチオニンを添加した10% FCS/DMEMから成るチェイス培地で、種々の時間、チェイスした。

【0025】

(免疫沈降/SDS-PAGE)

チェイス期間の終了後、培地を集めて直ちに氷上においた。ついで、3000×gで遠心分離を行い、細胞残屑を排除した。次に、プロテアーゼ阻害剤カクテル(1:1000; Sigma社)および0.025%のアジ化ナトリウムを加えた。その試料を、L652またはM2-アガロース(Sigma社)を用いて、一晚免疫沈降を行い、0.1%SDS、0.5%deoxycholic acidおよび1% TritonX-100を含むRIPAバッファーで三回洗浄した。そのあとに、トリス-トリシン10~20%勾配ゲル(Invitrogen社)を使用してSDS-PAGEを行った。細胞は、氷冷PBS中でかき集め、1500×gの遠心分離によって分離収集し、100μlの10倍濃度の前記RIPAで溶解した。そして、プロテアーゼ阻害混合液(1:500; Sigma社)を含む900μlのPBSを、前記溶解した細胞に加えた。不溶画分は、15000×gの遠心分離で分離し、その上清を免疫沈降に使用した。免疫沈降用の試料は、プロテインAセファロース(protein A sepharose; Sigma社)で前処理し、9E10またはM2アガロースで免疫沈降した。次に、洗浄したタンパク質試料を、8%若しくはトリス-トリシンSDS-PAGEにて分離した。ゲルを固定した後、増幅蛍光写真撮影法試薬(Amplify Fluorographic Reagent、Amersham社)中で振とうし、ついで乾燥し、最後にオートラジオグラフィーを行った。

【0026】

(免疫沈降/MALDI-TOF MS 解析)

F-NEXTおよびその派生物を安定に発現する細胞をコンフルエントな状態まで20cmディッシュで培養した後、培養培地を新しい10% FCS/DMEMと取り替えた。CO₂インキュベーター中で3時間培養した後、培養上清を集めてすぐに氷上におき、そして、遠心分離で細胞残屑を除去した。プロテアーゼ阻害混合液(1:1000)および0.025%アジ化ナトリウムを添加した後、その培地を、M2アガロースを使用して、4時間、4℃で免疫沈降した。そして、試料を、0.1% n-octylglucoside、140 mM NaCl、10 mM Tris (pH 8.0)および0.025%アジ化ナトリウムから

成るMS洗浄バッファーを使用し、10分間、4℃で3回洗浄した。そして、さらにもう一回、0.025 % アジ化ナトリウムを含む 10 mM Tris (pH 8.0) で洗浄した。その結果得られた沈殿に結合したペプチドを、 α -cyano-4hydroxy cinnamic acidで飽和したTFA/アセトニトリル/水 (TFA:アセトニトリル:水=1:20:20)で溶出した。可溶化した試料を、ステンレスプレート上で乾燥させ、MALDI-TOF MS解析にかけた。MSピークは、アンギオテンシン (Sigma社) およびインシュリン β 鎖 (Sigma社) で校正した。

【0027】

(実施例1)

培養上清中における、FLAG-NEXT (F-NEXT) のN末端フラグメント (NTF:F-N β) の検出

図1(a)にN Δ E、F-NEXTおよび NICDの構成を示す。図示のように、F-NEXTでは、NEXTのN末端に、シグナルペプチドとそれに続くFLAG配列および2つのメチオニンが挿入されている。図中の逆三角で示すように、F-NEXTでは1727番目のアミノ酸残基に変異を加えていないが、N Δ E (マウス N o t c h 1 (mN o t c h -1)) 中では、メチオニンをバリニンへ人為的に変異させてある (Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R. (1998). N o t c h -1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature. 393, 382-386.)。矢印は、S3タンパク質分解部位を示す。

【0028】

N Δ EおよびF-NEXTを安定に発現する細胞を、1時間(35 S)でパルスラベルし、図1(b)に示す時間チェイスした。その結果得た細胞の溶解物を、9E10で免疫沈降し、8%SDS-PAGEで解析した。図1(b)に示すように、2時間のチェイスの後、N Δ E (左パネル) およびF-NEXT (右パネル) のタンパク質分解が観察され、その結果、N Δ EおよびF-NEXTのバンドよりも速く移動するNICDバンドの生成が認められた。NICD生成効率は、N Δ EまたはF-NEXTを発現させた場合で違いがなかった。

【0029】

一方、前記培養上清を、M2アガロースで免疫沈降した。図1(b)の下パネ

ルに示すように、約 4 kDa の F-N β （本発明の新規ポリペプチド群の集合体）のバンドが、F-NEXT を安定に発現する細胞の 2 時間チェイスした培地からのみ同定された。このことは、NICD 生成時にその反対側のアミノ末端フラグメントが細胞外に分泌されているという全く新しい知見を示す。

【0030】

F-NEXT を発現する細胞を、(³⁵S) で 1 時間パルスラベルし、図 1 (c) に示した時間チェイスした。培地および溶解物中の F-N β を、上記の実験手法により調べた。図 1 (d) に示すように、F-N β （本発明の新規ポリペプチド群の集合体）の蓄積が、培地中ではチェイス時間の延長に応じて観察されたが、細胞溶解物中では殆ど検出できなかった。なお、電気泳動ゲルの写真撮影の露光時間を長くすると、培地中と同じ分子量の F-N β バンドが溶解物中でも検出できた（図示せず）。

【0031】

図 1 (b) および (d) に示した結果は、F-NEXT M1727V 変異体を使用した場合、または発現細胞として CHO、COS、N2a を用いた場合に再現できた（図示省略）。

【0032】

（実施例 2）

培養培地中における、N Δ E の N 末端フラグメント (NTF: N β) の検出。

N Δ E または NICD を安定に発現する K293 細胞を、(³H) で 2 時間パルスラベルし、6 時間チェイスした。チェイス培地および細胞溶解物を抗 N 抗体である L652 で免疫沈降し、その試料をトリス・トリシン SDS-PAGE で分離した。図 2 (a) に示すように、分子量 3 ~ 4 kDa の N Δ E の NTF バンド（矢印）は、N Δ E を発現する細胞の培養上清からは検出されたが、NICD を発現するものからは検出されなかった。また、このバンドの生成は細胞溶解物中には認められなかった。このことから、このバンドは FLAG タグされていない野生型の Nb であると考えられた。

【0033】

上記と同じ培地および溶解物を、抗 Myc 抗体 (9E10) を使用して、免疫沈降した。図 2 (b) 下パネルに示すように、約 100 kDa の N Δ E および NICD のバンドが、溶解物中では検出されたが、培地中では検出されなかった。この結果は、N Δ E

およびNICDがほぼ同じ速度で各細胞に発現していることを示している。

【0034】

(実施例3)

培養上清に放出されたN β のC末端の決定

図3 (b) に、マウスN o t c h -1 (mN o t c h 1) およびヒト β APPの膜内切断の概略を示す。mN o t c h 1は、膜内切断により、NICDとN β を生じる。この実施例では、N β の分泌およびそのC末端に新規のタンパク質切断部位を確認した。一方、 β APPは、膜内切断により、細胞内フラグメントCTF γ 50 (Sastre, M., Steiner, H., Fuchs, K., Capell, A., Multhaup, G., Condrón, M.M., Teplow, D.B., Haass, C. (2001). Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of N o t c h. EMBO Rep. 2, 835-841.) と、数種類のA β フラグメントを生じる。

【0035】

F-NEXTを安定に発現する細胞の培養上清を、M2アガロースで免疫沈降し、上記の実験手法により、N β の分子量をMALDI TOF/MSを使用して解析した。その結果を、図3 (a) グラフ (大) に示す。図示のように、分子量4000を中心に、多数のピークが観察されたが、4500より多い分子量の顕著なピークは確認されなかった。分子量3000から4500のピークの詳細を図3 (a) のグラフ (小) に示す。同じ主要なピークは、CHO、COSおよびN2aを宿主細胞として使用しても確認された(図示せず)。またF-NEXT M1727V変異体を感染させた場合でも確認された(図示せず)。

【0036】

図4 (a) に同図(b)に示したMALDI-TOF MSのピークに一致するN β のアミノ酸配列を示す。主要なN β のC末端は、アラニン1731である。太文字は、主要ピークのアミノ酸配列を示す。図示のように、S3切断部位に一致する5060付近の分子量のピークは、確認されなかった。この結果から、N β は細胞外に放出され、その直前のタンパク質分解部位はこれまで報告された3つのタンパク質分解部位 (S1, S2, S3) とは異なる、新規の第4のタンパク質分解部位 (S

4) であると結論できる。

【0037】

図4 (b) はヒト (h) とマウス (m) のNotch1～4タンパク質膜貫通部分のアミノ酸配列を列挙したものである。S1、S2、S3切断がNotch1～4に共通した現象であり、また種によらない共通したシグナル伝達機構であることからS4切断もまたすべてのNotch関連タンパク質に共通する現象であると推測できる。図示のようにS4部位はS3部位と同じように部分的に保存されており、このS4切断がNotch1～4タンパク質に共通する現象であると推察できる。

【0038】

(実施例4)

N β 細胞外放出のプレセニリン (PS) 機能依存性の確認

F-NEXTを、PS1野生型およびプレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体 (PS1 dominant negative mutant) であるPS1 D385Nを発現する細胞に安定的に感染させた。そして、これらのPS1派生物とF-NEXTを同時に発現する細胞から放出されるN β のレベルを、(³⁵S(で1時間パルスした後、2時間チェイスした培養上清および細胞溶解物を解析することにより調べた。まず、チェイス培地をM2アガロースゲルで免疫沈降し、N β 放出を検出した。図5 (a) の上パネルに示すように、PS1 D385N発現細胞からのN β の放出が、PS1野生型発現細胞と比較して著しく減少した。即ちプレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞ではS4切断効率が著しく減少した。また、同時に採取した細胞溶解物を、9E10を使用して免疫沈降した。図5 (a) の下パネルに示すように、2時間のチェイス期間後のNICDバンドが、PS1 D385N発現細胞では、ほとんど見ることができなかった。即ち、プレセニリン機能を人工的に消失させた突然変異体発現細胞ではS3切断効率が著しく減少するという報告を同時に再現した。

【0039】

つぎに、F-NEXTを安定に発現する細胞を、プレセニリンの活性中心に結合する γ -セクレターゼ阻害剤 (L685,458) を加えた場合と、加えない場合とで、1時間ラベルし、2時間チェイスした。すなわち、1 μ MのL685,458を、メチオニン飢餓状態にする2時間前に、培養培地に加えると同時にパルスーチェイス期間中

、使用する各培地に、同濃度のL685,458を含ませた。チェイス培地をM2で免疫沈降し、N β 放出を検出した。図5 (b) 上パネルに示すように、 γ -セクレターゼ阻害剤により、N β の細胞から放出が、著しく減少した。また、それに相当する溶解物を9E10で免疫沈降した。図5 (b) 下パネルに示すように、2時間のチェイス期間後のNICDバンドが、S3切断阻害によって、ほとんど確認できなかった。これらの結果から、N β の細胞外への放出はプレセニリン依存性タンパク質分解の働きによるものであり、プレセニリンの機能が阻害されると、S4切断およびそれに引き続くN β の放出も阻害されるといえる。

【0040】

(実施例5)

家族性アルツハイマー病 (FAD) 関連プレセニリン (PS) 突然変異体の S4 切断への影響

これまでFADに関連するPSの突然変異が分析された結果、すべての例でA β 42分泌の増加が確認されている。この実施例では、PS依存的S4タンパク質分解も、FAD関連PS突然変異に関係していることを確認した。

【0041】

野性型 (wt) PS1若しくはFAD関連PS1突然変異であるPS1 C92S, PS1 L166PおよびPS1 L286Vを発現するK293細胞に、F-NEXTを安定的に感染させた。そして、MALDI-TOF MSにより、F-N β のC末端の変化を確認するために、PS1派生物およびF-NEXTを発現する細胞の培養上清を分析した。図6aに示すように、N β のC末端タンパク質分解パターンの特徴的変化が野性型PS1に比較してFAD突然変異PS1発現細胞で確認できた。特に、A β 42生成を極めて上昇しているPS1 L166P突然変異では、F-N β ペプチドを長くする傾向が見られ、2および4アミノ酸残基長いF-N β 種 (F-N β 1733、1735) の生成の上昇が確認できた (図6b参照)。また、図6aに示すように、PS1 C92Sにおいて、F-N β 1734のレベルが向上し、PS1 L286Vにおいて、F-N β 1735のレベルが増加し、かつF-N β 1734のレベルが減少した。これらの結果から、FAD突然変異により、S4切断部位のパターンは影響を受け、C末端側にペプチド長が伸びる傾向があることが確

認められた。A β 42と同様に、アグレッシブなPS1 L166P突然変異が、F-N β のペプチド長に最も影響を与える。なお、PS1 L166Pは、成人初期のFADを引き起こすことが知られている。これらの効果は、K293細胞に限られず、Neuro2a細胞において、FAD関連PS突然変異の同様の効果も確認した（データ図示せず）。以上のことから、全てのFAD突然変異は、F-N β のC末端に対し、影響を及ぼすといえる（図6c参照）。

【0042】

【発明の効果】

以上のように、本発明の新規ポリペプチドは、Notchタンパク質由来であり、前記Notchタンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外におけるタンパク質分解に続く膜内タンパク質分解によりNICDが核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチドである。この新規ポリペプチドをマーカーとすることにより、Notchシグナル伝達を検出することができ、例えば、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス、アルツハイマー病等を検出することもできる。

【0043】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Industrial Promotion Organization
<120> New polypeptide originated from Notch
<160> 22

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> mouse

<400> 1

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala

20

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met

1

5

10

15

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> mouse

<400> 3

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> mouse

<400> 4

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala

20

<210> 6

<211> 23

<212> PRT

<213> mouse

<400> 6

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala Ala

20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> mouse

<400> 7

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe

20

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> mouse

<400> 8

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val

20 25

<210> 9

<211> 26

<212> PRT

<213> mouse

<400> 9

Val Lys Ser Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu

20 25

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> human

<400> 10

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met

1 5 10 15

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> human

<400> 11

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> human

<400> 12

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala

20

<210> 13

<211> 21

<212> PRT

<213> human

<400> 13

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1 5 10 15

Val Ala Ala

20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> human

<400> 14

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala

20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> human

<400> 15

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala Ala

20

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> human

<400> 16

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala Ala Phe

20

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> human

<400> 17

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val

20

25

<210> 18

<211> 26

<212> PRT

<213> human

<400> 18

Val gln Ser Glu thr Val Glu Pro Pro Pro Pro Ser Gln Leu His Phe Met Tyr

1

5

10

15

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu

20

25

<210> 19

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 19

atcgctcgtcc ttgtagtctc tcaagcctct tgcgccgagc gcgggcagca gcgttag 57

<210> 20

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 20

gacaagatgg tgatgaagag tgagccggtg gagcctccgc tgcctcgca gctg 54

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 21

cctcgagct gcacctcatg tacgtggcag cg 32

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 22

cgctgccag tacatgaggt gcagctgcga 30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 (a) は、NΔE、F-NEXTおよびNICDの構成を示す図であり、図 1 (b) ~ (c) は、本発明のFLAGタグされた新規ポリペプチド (Nβ) の生成の一例を示す電気泳動の写真である。

【図 2】

図 2 (a) ~ (b) は、本発明の新規ポリペプチド ($N\beta$) の生成の一例を示す電気泳動の写真である

【図 3】

図 3 (a) は、本発明の新規ポリペプチド群の質量分析チャートであり、図 3 (b) は新規の Notch タンパク質切断部位 (S4) の主要な部位およびアルツハイマー病アミロイド β ($h\beta APP$) タンパク質前駆体の主要な切断部位を、それぞれ示す。

【図 4】

図 4 (a) は、本発明の本体である新規ポリペプチドのアミノ酸配列の例を示す図である。図 4 (b) は Notch 1 ~ 4 および $h\beta APP$ の膜内アミノ酸配列を比較したものである。

【図 5】

図 5 (a), (b) は、本発明の新規ポリペプチド ($N\beta$) の細胞外放出におけるプレセニリン (PS) の機能阻害の影響の一例を示す電気泳動写真である。

【図 6】

図 6 (a) は、 $N\beta$ 放出におけるアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響の一例を示す質量分析チャートの一例である。図 6 (b) はアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体の影響により分泌量が相対的増加する $N\beta$ 種を示したものである。図 6 (c) は分泌量の相対的増加を半定量したものである。

【図 7】

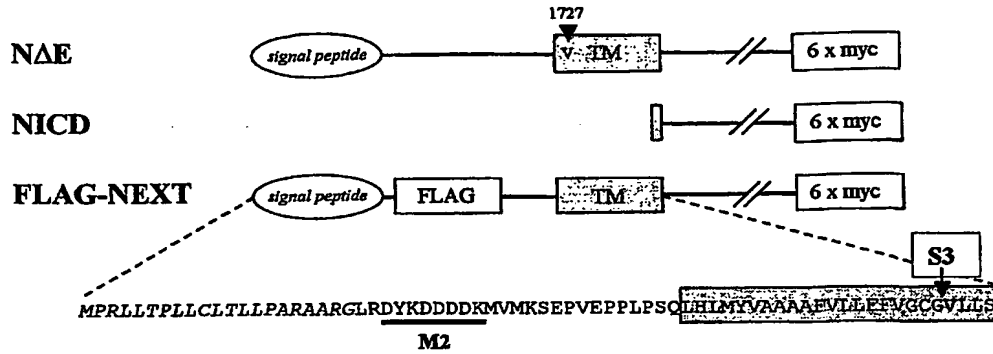
本発明の新規ポリペプチド ($N\beta$) の細胞外放出の一例およびその放出ペプチドの C 末端がアルツハイマー病原性プレセニリン突然変異体により変化することを説明する図である。

【書類名】

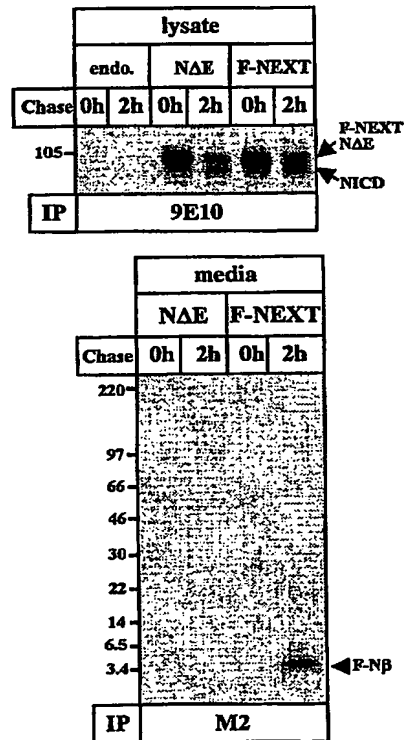
図面

【図 1】

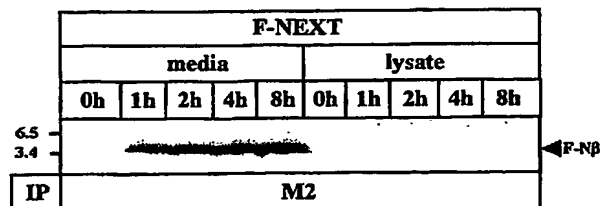
a



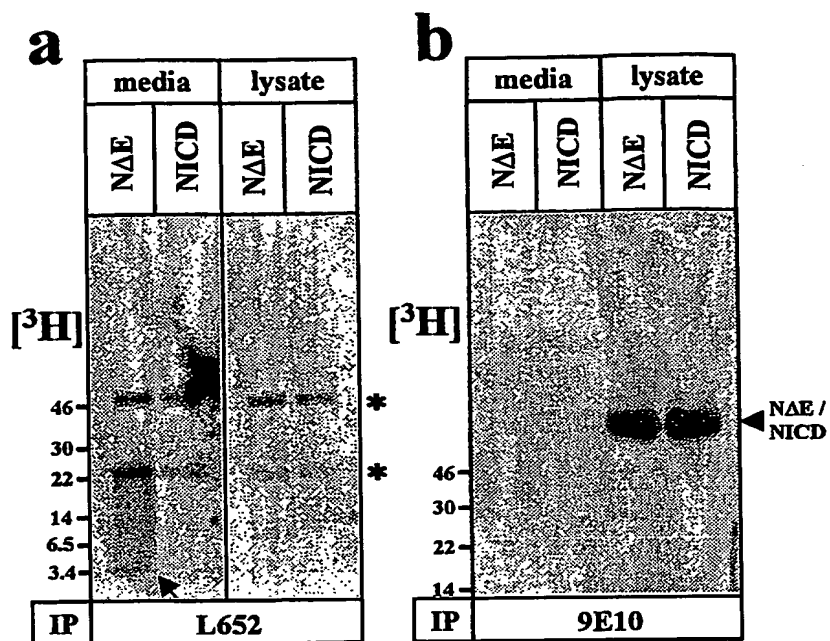
b



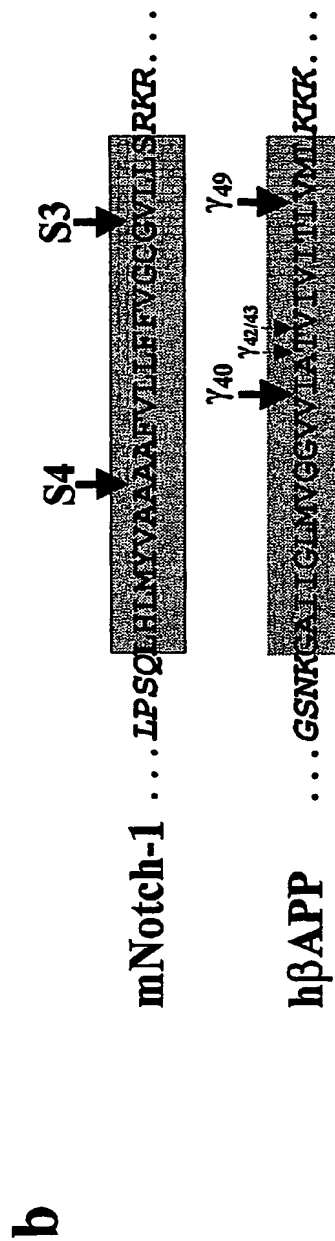
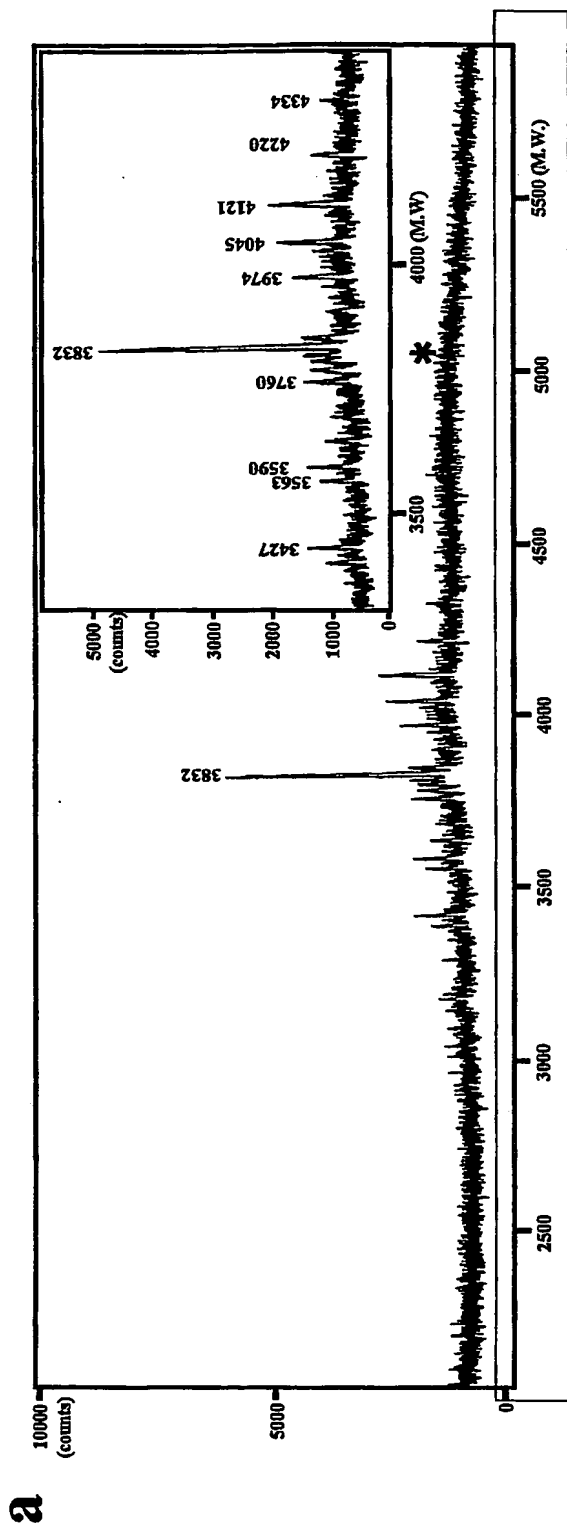
c



【図 2】



【図 3】



【図 4】

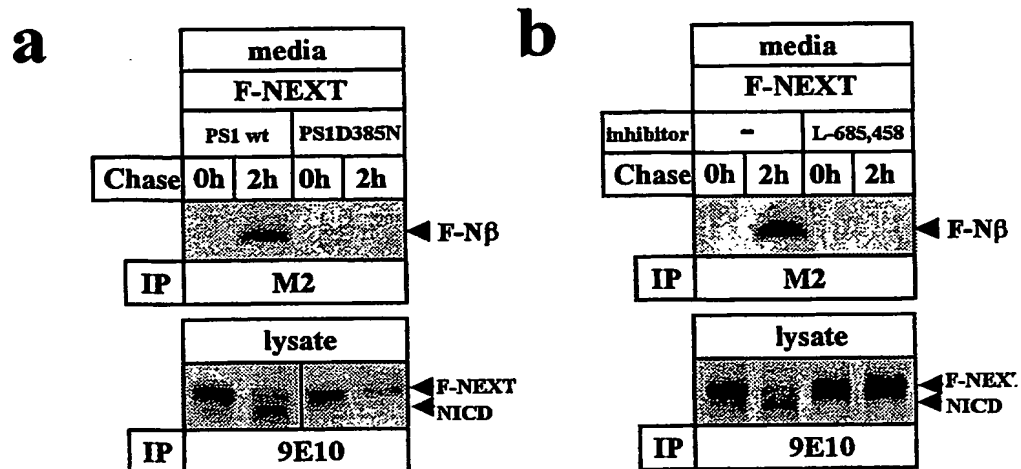
a

N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAAAFAFVLLFFVGGC ¹⁷⁴³ -C	TM	(M.W. 5057.67)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAAAFAFV ¹⁷³⁶ -C		(M.W. 4333.81)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAAAFAFV ¹⁷³⁵ -C		(M.W. 4220.66)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAAAFAF ¹⁷³⁴ -C		(M.W. 4121.53)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAAA ¹⁷³³ -C		(M.W. 3974.36)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C		(M.W. 4045.45)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C		(M.W. 3832.22)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³¹ -C		(M.W. 3562.89)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMYVAA ¹⁷³⁰ -C		(M.W. 3761.15)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHLMY ¹⁷²⁸ -C		(M.W. 3590.95)
N-LRDYKDDDDKVMKSEPEPPLPSQ	LHIM ¹⁷²⁷ -C		(M.W. 3427.78)

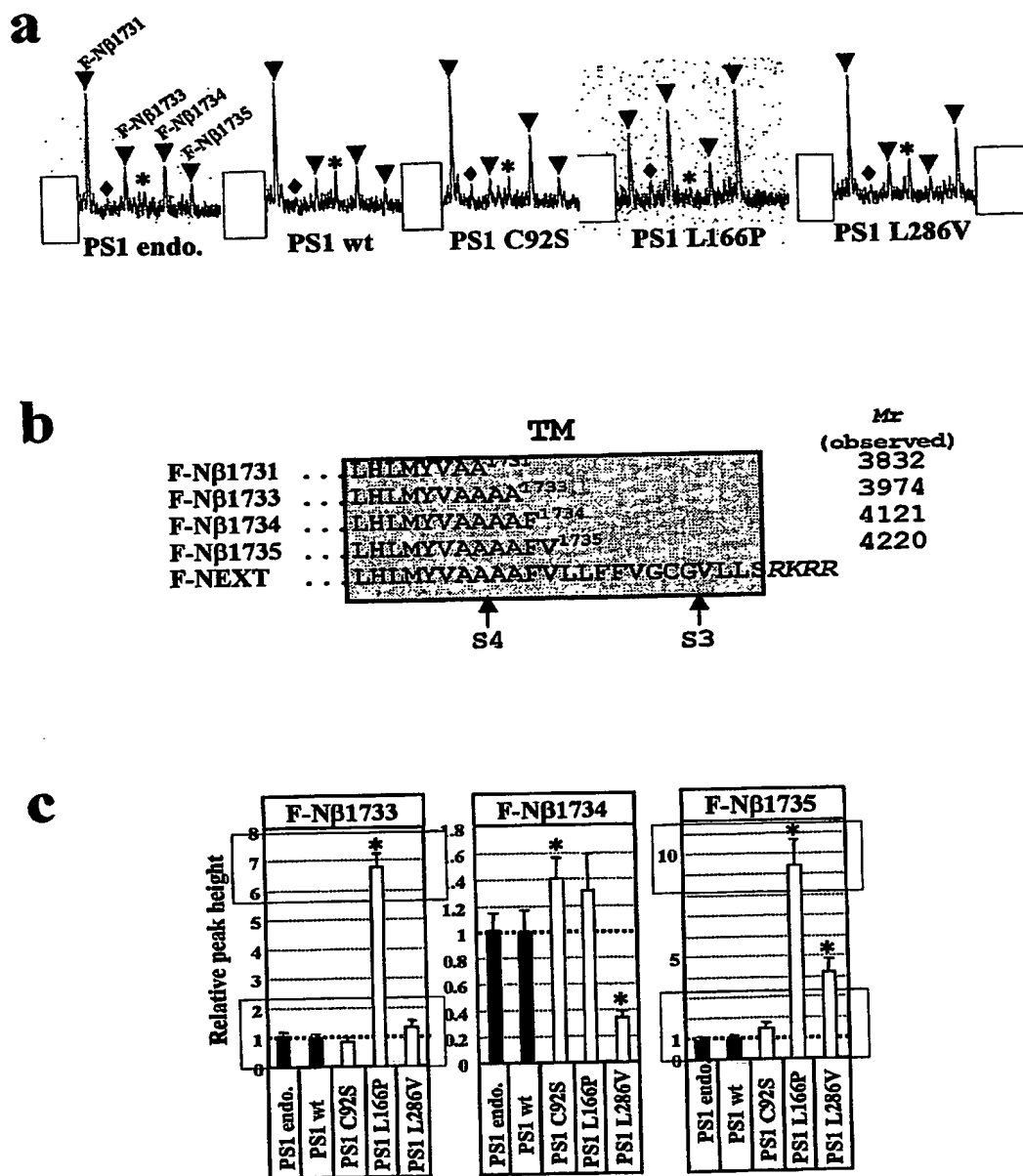
b

mNotch-1	LHLMYVAA ¹⁷³⁶ AAFVLLFFVGGC-VLL	TM
hNotch-1	LHFMVAA-AAFVLLFFVGGC--VLL	
mNotch-2	--LLYLLA-VAVVIILFFILLG-VIMA	
hNotch-2	--LLYLLA-VAVVIILFIILLG-VIMA	
mNotch-3	--LLPLLIV-AGAVELLIIIFILG-VMVA	
hNotch-3	--LLPLLIV-AGAVLLLVILVLG-VMVA	
mNotch-4	--ILCSPV-VG-VLLLALGALL-VLQLI	
hNotch-4	--VLCSPV-AG-VILLALGALL-VLQLI	
hβAPP	GAIIGLMVGGVV ¹⁷³⁶ IATVI-VITL ¹⁷³⁶ VML	

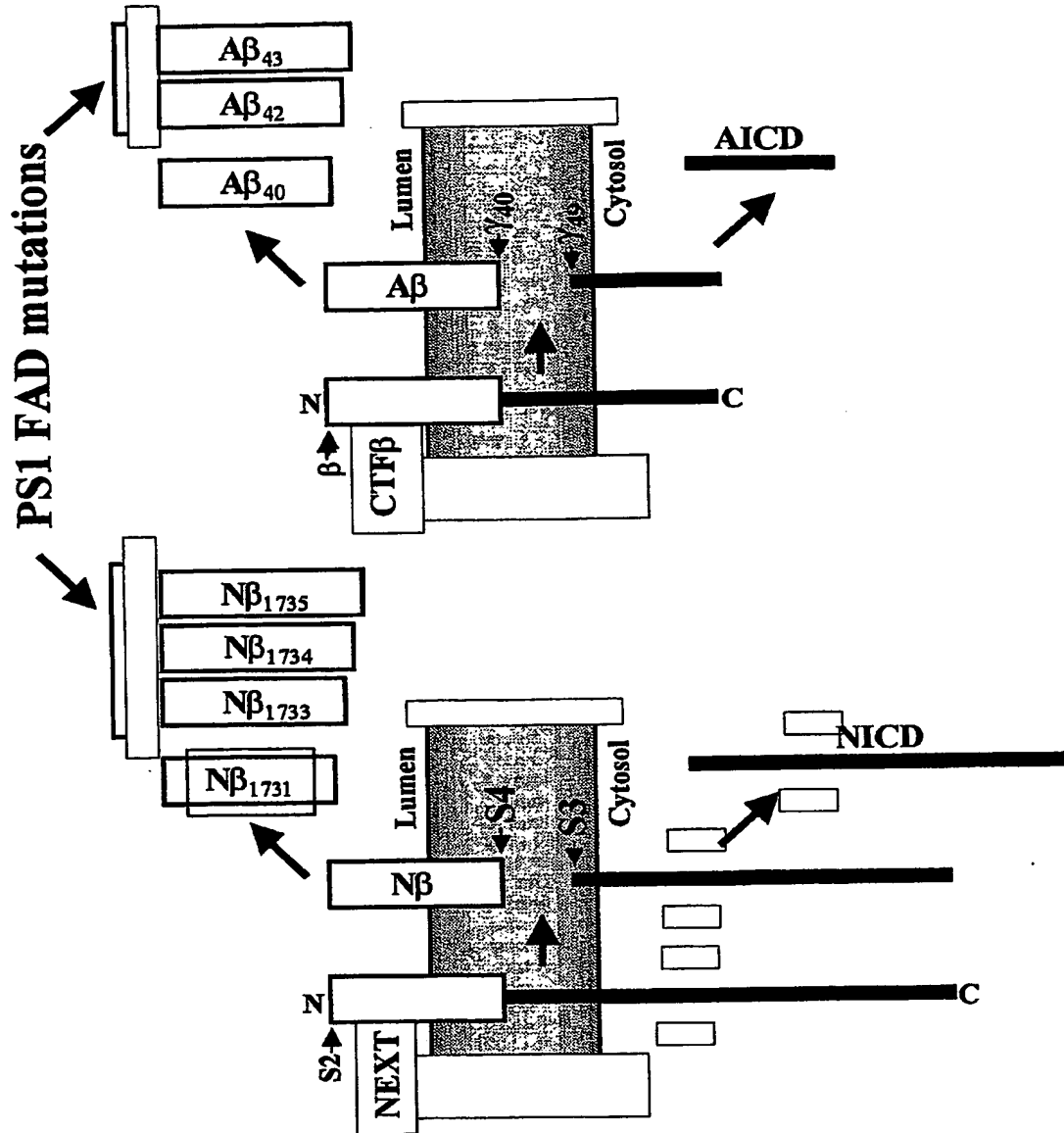
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Notch シグナル伝達を検出できる細胞外マーカーを提供する。

【解決手段】 Notch タンパク質由来の新規ペプチド群であり、前記 Notch タンパク質の一連のタンパク質分解において、細胞外部分における分解に続く膜内でのタンパク質分解により NICD (Notch intracellular cytoplasmic domain) が核内に移行する際に、細胞外に放出されるポリペプチド ($N\beta$) をマーカーとする。このペプチド群 ($N\beta$) は、Notch シグナルに比例して細胞外に放出され、プレセニリン (presenilin) 依存である。このペプチド群を検出することにより、Notch シグナル伝達、細胞分化、細胞の腫瘍化、アポトーシス及びアルツハイマー病等をモニターできる。

【選択図】 図 7

特願 2002-210040

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[801000061]

1. 変更年月日

2001年 9月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区本町橋2番5号 マイドームおおさか内

氏 名

財団法人大阪産業振興機構